

# GSK-3 $\beta$ : central regulator of skeletal muscle plasticity

Citation for published version (APA):

van der Velden, J. L. (2008). GSK-3 $\beta$  : central regulator of skeletal muscle plasticity. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20080228jv>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2008

**DOI:**

[10.26481/dis.20080228jv](https://doi.org/10.26481/dis.20080228jv)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

## LAYMAN'S SUMMARY

---

Muscle wasting commonly occurs in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Independent of the severity of airflow obstruction, muscle wasting is associated with skeletal muscle weakness, exercise impairment, decreased health status and increased mortality. Interestingly muscle wasting is not exclusive to COPD but occurs in many chronic inflammatory diseases. Prevention and treatment of muscle wasting is therefore increasingly recognized as a prerequisite in an integrated disease management approach of these chronic disorders.

In order to reach this goal it is essential to comprehend the mechanisms of muscle growth. Under normal healthy conditions skeletal muscle has a high degree of plasticity which allows it to adapt easily to changes in functional demand. For example, repeated strength training will result in muscle growth (*hypertrophy*). Conversely, periods of inactivity - e.g. during casting of a broken leg or under pathological conditions as mentioned earlier - will result in a loss of muscle mass (*atrophy*). The process responsible for recovery of lost muscle, for example if physical activity is resumed, is called *regeneration*. Two important cellular processes are required for muscle regeneration: 1) *muscle fiber hypertrophy* defined as an increase in protein synthesis and 2) *myonuclear accretion* defined as the fusion of single nucleated differentiating muscle cells (*myoblasts*) with existing muscle fibers (Figure 3 and 4 introduction). Myonuclear accretion during muscle growth is essential for maintenance of the *myonuclear domain*, which is defined as the ratio between the cytoplasm of the muscle fiber and the number of nuclei.

Muscle growth can be stimulated by Insulin-like growth factor-I (IGF-I), but the mechanisms contributing to IGF-I induced muscle growth that have been identified mainly concern those governing muscle hypertrophy. For this reason, we investigated the role of the IGF-I signaling pathway during skeletal muscle regeneration. To this end, we first examined the response of the IGF-I pathway during muscle regeneration after recovery from muscle atrophy by using a mouse model (*in vivo*) of reversible inactivity-induced atrophy. Mice were hind limb-suspended for 2 weeks, which resulted in atrophy of the hind limb musculature. Resumption of normal cage activity by ending the suspension initiated regeneration, which resulted in restoration of the lost muscle mass.

This experiment revealed that IGF-I mRNA expression is enhanced during muscle recovery following atrophy, and that muscle regeneration was accompanied by activation of the IGF-I signal transduction pathway.

Signal transduction refers to processes by which a cell converts one kind of signal or stimulus into a cellular response. In case of IGF-I, binding to its receptor on the cell membrane induces for instance changes in protein synthesis, cell proliferation and differentiation, by initiating changes in the activity of a cascade of signalling proteins. One of the signalling proteins of IGF-I is Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Interestingly, in our mouse model myonuclear accretion during restoration of lost muscle mass was accompanied by inactivation of GSK-3 $\beta$ .

To study whether and how GSK-3 $\beta$  inactivation is causally related to muscle regeneration, a cell culture (*in vitro*) system of mouse skeletal muscle myoblasts (C2C12 cells) was employed. C2C12 myoblasts can differentiate into multinucleated muscle fibers (*myotubes*), and during this differentiation process the effects of IGF-I on muscle specific proteins and myoblast fusion were examined.

The experiment showed that IGF-I positively affects muscle differentiation, while it simultaneously inactivated GSK-3 $\beta$ . Additional experiments demonstrated that either pharmacological or genetic inhibition of GSK-3 $\beta$  is sufficient to enhance muscle differentiation in C2C12 cells. Further research demonstrated that inactivation of GSK-3 $\beta$  leads to an increase in nuclear translocation of a regulatory protein, Nuclear Factor of Activated T-cells c3 (NFATc3), which by itself is sufficient to increase muscle gene

expression. Finally, in C2C12 cells in which NFATc3 expression was suppressed, differentiation could not be further enhanced through inhibition of GSK-3 $\beta$ . This data demonstrates that stimulating muscle differentiation by inhibition of GSK-3 $\beta$  requires NFATc3.

Beside the inhibiting effects of IGF-I signaling on GSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$  can also be inhibited through the Wnt signaling. This pathway is associated with muscle growth primarily during embryogenesis. Our experiments in differentiating C2C12 cells demonstrated that the addition of Wnt3a spectacularly improved fusion of C2C12 myoblasts into myotubes. Surprisingly, improved fusion attributable to Wnt3a was not accompanied by an increase in muscle specific protein expression, although pharmacological and genetic inhibition of GSK-3 $\beta$  led to both an increase in fusion and muscle specific protein expression. A possible explanation for this observation is the fact that two different GSK- $\beta$  pools are present in myoblasts. Whereas inhibition of the IGF-I sensitive pool of GSK-3 $\beta$  results in an increase in muscle specific proteins, inhibition of GSK-3 $\beta$  by the Wnt signaling cascade mainly results in an enhanced fusion of myoblasts into multinucleated myotubes.

Although the main focus of this thesis was to investigate the role of GSK-3 $\beta$  during muscle differentiation and regeneration, a series of pilot experiments revealed that GSK-3 $\beta$  activity is also required for atrophy signaling in fully differentiated myotubes.

Based on the results of this thesis summarized above, it is concluded that the signaling protein GSK-3 $\beta$  is a central negative regulator of skeletal muscle plasticity and a promising therapeutic strategy to prevent muscle wasting and promote muscle regrowth in COPD patients and other chronic wasting disorders.

---

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

---



Verlies van spiermassa komt vaak voor bij chronische obstructieve longziekten (COPD) en is onafhankelijk van de ernst van de longfunctiestoornis geassocieerd met skeletspierzwakte, een verminderde inspanningstolerantie, een verminderde kwaliteit van leven en zelfs een verhoogd sterfterisico. Dit fenomeen treedt niet alleen op bij patienten met COPD maar kenmerkt veel andere chronische ziekten zoals chronisch hartfalen, chronisch nierfalen, Reumatoïde artritis en kanker. Preventie en behandeling van spiermassaverlies wordt daarom in toenemende mate onderkend als een belangrijke pijler in een geïntegreerde aanpak van deze chronische ziekten. Hiertoe is het essentieel om de mechanismen van spieraftbraak en spiergroei te doorgronden. De gezonde skeletspier is plastisch en kan zich aanpassen naargelang het gebruik van de spier. Bijvoorbeeld, na repeterende krachttraining zal een spier in omvang toenemen (*spiergroei*), terwijl als gevolg van inactiviteit bij een gebroken been, of -zoals eerder genoemd- als gevolg van een chronische ziekte er juist verlies van spiermassa (*spieratrofie*) optreedt. Het herstel van verloren spiermassa noemt men *spierregeneratie*. Twee belangrijke cellulaire processen spelen een rol tijdens spierregeneratie 1) *spiervezelhypertrofie* en 2) *spierkernaanwas* (*myonucleaire accretie*). Onder spiervezelhypertrofie verstaan we de verhoogde eiwit aanmaak die plaatsvindt tijdens spiergroei. Met kernaanwas bedoelen we het proces van het fuseren van eenkernige, differentiërende spiercellen (*myoblasten*) met bestaande spiervezels (Figuur 3 en 4 Introduction). Deze kernaanwas is nodig om het *myonucleaire domein*, de ratio tussen het cytoplasma van de spiervezel en het aantal kernen, tijdens spiervezelhypertrofie in stand te houden. Beide processen zijn daarom onlosmakelijk met elkaar verbonden.

Een belangrijke stimulerende rol in spiergroei is weggelegd voor het eiwit Insuline-Growth-Factor I (IGF-I), maar de wijze waarop IGF-I betrokken is bij spierregeneratie is nog onvoldoende opgehelderd. In dit proefschrift is de rol van de IGF-I signaleringscascade onderzocht tijdens spierregeneratie.

Hiertoe is in eerste instantie onderzocht hoe de IGF-I signalerings transductie cascade zich gedraagt tijdens spierregeneratie in de herstelfase na spieratrofie. Dit hebben we bestudeerd door gebruik te maken van een muizenmodel (*in vivo*) van (reversibele) inactiviteit-geïnduceerde spieratrofie. De achterpoten van muizen worden ontlast voor 2 weken, hetgeen resulteert in atrofie van de achterpoot musculatuur. Het terugplaatsen van de muizen op hun poten start het regeneratieproces van de verloren spiermassa. Uit de experimenten bleek dat IGF-I mRNA expressie tijdens spierregeneratie na atrofie verhoogd is en dat de IGF-I signaaltransductie cascade geactiveerd is.

Signaal transductie verwijst naar een proces waarbij een cel een signaal of stimulus omzet in een nieuw signaal. Wanneer bijvoorbeeld IGF-I aan zijn receptor op het celmembraan bindt leidt dit tot veranderingen in eiwit-aanmaak, celdeling en differentiatie door veranderingen in de activiteit van verschillende signaleringseiwitten.

Een van de signaaleiwitten van IGF-I is Glycogeen Synthase Kinase-3beta (GSK-3 $\beta$ ). In ons muizenmodel bleek dat kernaanwas tijdens herstel van verloren spiermassa gepaard gaat met inactivatie van GSK-3 $\beta$ . Om verder te onderzoeken of GSK-3 $\beta$  inactivatie belangrijk is in spierregeneratie hebben we gebruikt gemaakt van een celweek systeem (*in vitro*) van muizen skeletspier myoblasten (C2C12 cellen) die zich kunnen omvormen (*differentiëren*) tot meerkernige spiervezels (*myotubes*). Tijdens dit proces van differentiatie zijn de effecten van IGF-I op expressie van spierspecifieke eiwitten en myoblast fusie gemeten. Uit de experimenten bleek dat IGF-I spierdifferentiatie positief beïnvloedt en dat dit gepaard gaat met inactivatie van GSK-3 $\beta$ . Uit vervollexperimenten kwam naar voor dat zowel farmacologische als genetische inactivatie van GSK-3 $\beta$  voldoende is om de spierdifferentiatie in C2C12 cellen te verbeteren. Verder onderzoek wees uit dat inactivatie van GSK-3 $\beta$  leidt tot een verhoogde nucleaire translocatie van een regulerend eiwit, Nuclear Factor of Activated T cells c3 (NFATc3). NFATc3 over-expressie alleen bleek op zich al voldoende is om

spiergenexpressie te bevorderen. Tenslotte bleek dat in spiercellen waarin NFATc3 expressie was onderdrukt, het differentiatie proces niet meer bevorderd kon worden via inhibitie van GSK-3 $\beta$ , waardoor we kunnen concluderen dat NFATc3 vereist is voor stimulatie van spierdifferentiatie via inhibitie van GSK-3 $\beta$ .

Naast IGF-I signalering wordt GSK-3 $\beta$  onderdrukt door de Wnt signaleringscascade, welke ook in verband staat met spiergroei. Een rol van Wnt in spiergroei is met name beschreven tijdens de embryonale ontwikkeling. Uit onze experimenten met differentiërende C2C12 myoblasten bleek Wnt3a de fusie van myoblasten tot meerkernige myotubes sterk te verbeteren. Het verrassende resultaat was echter dat Wnt3a geen verhoogde spierspecifieke eiwitexpressie tot gevolg had, terwijl beide aspecten van spierdifferentiatie wel werden gestimuleerd door farmacologische of genetische inhibitie van GSK-3 $\beta$ . Deze resultaten zijn te verklaren door het feit dat er twee verschillende GSK-3 $\beta$  pools aanwezig zijn in myoblasten. Inhibitie van de IGF-I gevoelige GSK-3 $\beta$  pool resulteert met name in een verhoging van spierspecifieke eiwitten. Daarnaast resulteert inhibitie van de Wnt gevoelige pool met name in een verbeterde fusie van myoblasten tot meerkernige myotubes.

Zoals eerder aangegeven wordt spiermassa bepaald door de balans tussen spiergroei en spieraafbraak. De focus van dit proefschrift lag op de rol van GSK-3 $\beta$  tijdens spierdifferentiatie en –regeneratie. Desalniettemin toonden we in een serie pilotexperimenten aan dat GSK-3 $\beta$  activiteit vereist is voor atrofiesignalering in gedifferentieerde myotubes.

Gebaseerd op de bovenstaande bevindingen concluderen we dat het signaleringseiwit GSK-3 $\beta$  een centrale, negatieve regulator is van spiermassabehoud, spierdifferentiatie en –regeneratie. Gerichte fysiologische of farmacologische modulatie van GSK-3 $\beta$  is mogelijk een veelbelovende behandelingsstrategie om spiermassaverlies te voorkomen en spiergroei te bevorderen in COPD en andere chronische aandoeningen.